

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno–matematički fakultet
Biološki odsjek

Hrvoje Hodak

Učinak uvjeta sušenja na fenolni sastav i antioksidacijski kapacitet
imele (*Viscum album* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Gordani Rusak na razumjevanju, uvažavanju mojih ideja i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala dr. sc. Valeriji Vujčić Bok i doc. dr. sc. Ivani Šoli na strpljenju i pomoći kod spektrofotometrijskih metoda i HPLC analize.

Hvala Darinki i Jakobu na njihovom društvu i pomoći oko snalaženja u laboratoriju.

Posebno hvala mojim roditeljima na podršci i velikom strpljenju.

Ovaj rad, izrađen u Fitokemijskom laboratoriju Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta , pod vodstvom prof. dr. sc. Gordane Rusak, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINAK UVJETA SUŠENJA NA FENOLNI SASTAV I ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET IMELE (*Viscum album* L.)

Hrvoje Hodak

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bijela imela (*Viscum album* L.), vrsta imele iz porodice *Santalaceae*, je vazdazelena, drvenasta biljka koja kao epifitski obligatni poluparazit raste na velikom broju drvenastih vrsta. Imela se koristi u tradicionalnoj medicini za liječenje čitavog niza oboljenja. Dio imeline ljekovitosti može se pripisati fenolnim spojevima. Dosadašnja istraživanja su pokazala kako ovisno o biljci domaćinu, vremenu ubiranja i pripremi biljnog materijala sastav i količina fenolnih spojeva, kao i antioksidacijska aktivnost vezana uz njih, jako variraju. Istraživanje je izvršeno na lišću imela koje su rasle na lipi, glogu i javoru. Sa svakog stabla sakupljeno je lišće s peteljka s po jedne imele. Lišće s peteljka svake od imela je podijeljeno na dva približno jednaka dijela od kojeg je jedan sušen na sobnoj temperaturi u sjeni dok je drugi liofiliziran. Mjeren je antioksidacijski kapacitet trima spektrofotometrijskim metodama, količina ukupnih fenolnih spojeva metodom Folin-Ciocalteu dok su pojedini fenolni spojevi detektirani metodom tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s obrnutim fazama (RP-HPLC). Utvrđeno je da imela koja je rasla na glogu najbogatija fenolnim tvarima, te kako gledajući u cjelini ima veći antioksidacijski kapacitet u usporedbi s ostalim uzorcima. Liofilizirani uzorci pokazali su veći antioksidacijski kapacitet od svojih na sobnoj temperaturi sušenih parova. Liofilizacija je pokazala pozitivan učinak na očuvanje koncentracije *p*-kumarinske i sinapilne kiseline.

(28 stranica, 14 slika, 52 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: ABTS, DPPH, FRAP, RP-HPLC, *p*-kumarinska kiselina, sinapilna kiselina

Voditelj: prof. dr. sc. Gordana Rusak, red. prof.

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Gordana Rusak, doc. dr. sc. Ivana Buj, doc. dr. sc. Dubravko Pavoković

Rad prihvaćen: 13.2.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

EFFECTS OF DRYING CONDITIONS ON PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF MISTLETOE (*Viscum album* L.)

Hrvoje Hodak

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Common mistletoe (*Viscum album* L.), a species of mistletoe in the family *Santalaceae*, is a evergreen shrub that grows on a variety of woody plants as a epiphytic hemiparasite. Mistletoe is used in traditional medicine for treatment for number of different ailments. Mistletoe's positive effects on health can be partially attributed to it's phenolic content. Recent studies have shown that phenolic content and antioxidant capacity of mistletoe varies depending on plant host, time of the year in which it was collected and preparation of the plant material. Subject of this study were leaves with their petioles from mistletoes that grew on linden, hawthorn and maple from which half of plant material was freeze-dried while other half was dried in shadow at room temperature. Three different spectrophotometric methods were used for measuring the antioxidant capacity, Folin-Ciocalteu method was used for measuring total phenolic content while reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was used for detection of specific phenolic compounds and their concentrations. Results show that mistletoe that grew on hawthorn had highest concentration of total phenolics and generally had highest antioxidant capacity. Freeze-dried samples had higher antioxidant capacity then their corresponding air-dried pairs. Freeze-drying has shown positive effect on preserving of *p*-coumaric acid and sinapinic acid.

(28 pages, 14 figures, 52 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: ABTS, DPPH, FRAP, RP-HPLC, *p*- coumaric acid, sinapinic acid

Supervisor: dr. sc. Gordana Rusak, prof.

Reviewers: dr. sc. Gordana Rusak, prof.; dr. sc. Ivana Buj, doc.; dr. sc. Dubravko Pavoković, doc.

Thesis accepted: 13.2.2019.

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
2.	Materijali i metode.....	6
2.1.	Biljni materijal	6
2.2	Metode	6
2.2.1.	Priprema ekstrakta.....	6
2.2.2.	Određivanje antioksidacijskog kapaciteta.....	7
2.2.2.1.	Metoda ABTS	7
2.2.2.2.	Metoda DPPH	8
2.2.2.3.	Metoda FRAP	8
2.2.3.	Kvantitativna i kvalitativna analiza fenolnih spojeva	9
2.2.3.1.	Mjerenje ukupnih fenola	9
2.2.3.2.	RP-HPLC metoda	10
2.2.4.	Statistička obrada podataka.....	11
3.	Rezultati	12
3.1.	Antioksidacijski kapacitet	12
3.1.1.	ABTS metoda.....	12
3.1.2.	DPPH metoda.....	12
3.1.3.	FRAP metoda.....	13
3.2.	Kvantitativna i kvalitativna analiza fenolnih spojeva	14
3.2.1.	Mjerenje ukupnih fenola	14
3.2.2.	Mjerenje pojedinačnih fenolnih spojeva RP-HPLC metodom	15
4.	Rasprava.....	20
5.	Zaključak.....	23
6.	Literatura.....	24

1. Uvod

Čovjek od svojih početaka koristi biljke za ublažavanje simptoma i liječenje bolesti. Postoje indicije da su već neandertalci koristili ljekovito bilje oko 60000 godina prije Krista (Lietava, 1991), a najraniji pisani dokazi o čovjekovom korištenju biljaka, sumeranske glinene pločice s receptima za 12 ljekovitih biljnih mješavina u kojima se spominje preko 250 biljaka, pronađeni su u Nagpuru u današnjoj Indiji i stare su oko 5000 godina (Sumner, 2000). Procjenjuje se da se danas i do 80% svjetske populacije barem djelomično koristi tradicionalnom medicinom i ljekovitim biljem (Farnsworth i sur., 1985). Takav oblik medicine najčešće se koristi u zemljama u razvoju, gdje je ponekad i jedini oblik zdravstvene zaštite, ali u novije vrijeme sve je rašireniji i u razvijenim zemljama (Ekor, 2014). Zbog tog velikog broja ljudi koji se koristi ljekovitim biljkama, kao i zbog velike varijabilnosti u kvaliteti biljnih pripravaka na koju utječu način sabiranja, sušenja i pohranjivanja biljnog materijala, kao i razlike u sastavu sekundarnih metabolita između jedinki iste vrste, postoji potreba za standardizacijom biljnih pripravaka (Kunle i sur., 2012).

Biljke sintetiziraju velik broj različitih spojeva koje obično dijelimo na primarne i sekundarne metabolite. Primarni metaboliti su spojevi koji su biljkama neophodni za fotosintezu, stanično disanje te za rast i razvoj, dok različiti sekundarni metaboliti imaju širok spektar uloga: zaštita biljke od herbivora i mikrobnih infekcija, privlačenje oprašivača i životinja koje prenose sjemenke, zaštita od UV zračenja, alelopatska aktivnost, signalizacija simbiotskim mikroorganizmima u tlu itd. Sekundarni metaboliti su velika skupina raznolikih spojeva koje prema njihovom postanku možemo podijeliti na: fenolni, odnosno polifenolne spojevi u koje ubrajamo flavonoide, terpenoide, spojeve koji sadrže dušik (alkaloidi) i spojeve koji sadrže sumpor. Mnogi su sekundarni metaboliti komercijalno značajni jer ih čovjek koristi kao bojila, ljepila, ulja, voskove, vlakna, parfeme i lijekove te su potencijalni izvori novih lijekova, insekticida i herbicida (Croteau i sur., 2000; Dewick, 2002).

Fenolni spojevi su u biljnom carstvu veoma raširena skupina spojeva koji sadrže barem jedan aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, a do danas ih je detektirano preko 8000 (Strack, 1997). Fenolni spojevi se mogu dijeliti na različite načine, na primjer prema funkcionalnim skupinama vezanim na fenolnu skupinu ili prema broju fenolnih jedinica u molekuli (Buchanan i sur., 2015). Jedna od podjela je podjela na flavonoide (fenolni spojevi s 15 ugljikovih, koji sadrže dva aromatska prstena povezana preko tri ugljikova atoma)

i različite neflavonoidne spojeve. Flavonoide dalje dijelimo na flavonole, flavone, flavan-3-ole, antocijanidine, flavanone i izoflavone. Neflavonoidni fenolni spojevi važni u ljudskoj prehrani su fenolne kiseline (C_6-C_1), hidroksicinamati (C_6-C_3) i njihovi derivati, te polifenoli stilibeni ($C_6-C_2-C_6$) (Corzier, 2006). Fenolni spojevi imaju brojne raznolike uloge kod biljaka, pa tako i pomažu biljci kod oksidativnog stresa (Chua i sur., 2016).

Reaktivne vrste kisika su skupina spojeva s kisikom koji normalno nastaju u metabolizmu stanice. Kako su veoma reaktivni mogu oštetiti DNA, lipide i proteine u stanici i inhibirati njihove funkcije. Da do toga ne bi došlo u stanici postoje različiti antioksidacijski mehanizmi koje možemo podijeliti na preventivne mehanizme, mehanizme popravka, fizičku obranu i antioksidacijski obrambeni mehanizam. Antioksidacijski obrambeni mehanizam se sastoji od enzimatski antioksidacijski mehanizam (različiti specijalizirani enzimi) i neenzimatski antioksidacijski mehanizmi (vitamini C i E, glutation, karotenoidi, flavonoidi i dr.). U normalnim uvjetima u stanici postoji ravnoteža između reaktivnih vrsta kisika s jedne strane i enzimatskih i neenzimatskih antioksidansa s druge strane. Oksidativni stres je stanje kod kojeg dolazi u slučaju pretjerane proizvodnje reaktivnih vrsta kisika i slabljenja antioksidacijskih mehanizama. Ovo stanje igra važnu ulogu u fiziopatologiji diabetesa, različitih kardiovaskularnih, neurodegenerativnih (Alzheimerova i Parkinsonova bolest) i autoimunih bolesti te se veže uz proces starenja (Valko i sur., 2007). Različite antioksidanse možemo unjeti u organizam prehranom, a od takvih prehranom unešenih antioksidansa glavninu čine fenolni spojevi biljnog podrijetla (Blomhoff, 2010).

Jedna od biljaka korištenih u tradicionalnoj medicini je i bijela imela (*Viscum album* L.) iz porodice *Santalaceae*, vazdazelena drvenasta trajnica koja kao epifitski poluparazit živi na drveću i grmlju. Možemo je naći u gotovo cijeloj Europi, od Velike Britanije na zapadu do Crnog mora i Kaspijskog jezera na istoku, te od juga Švedske na sjeveru do Sicilije i Cipra na jugu (Nikolić, 2013). Imelu su prema djelu *Naturalis Historia* Plinija Starijeg koristili već Kelti za liječenja neplodnosti stoke i kao protuotrov, a u istom djelu se spominje i ritual hrasta i imele koji je Keltima bio važna svetkovina. Lišće imele zajedno s peteljka i granama je ljekovito (Phalow, 1989), dok se bobice smatraju otrovnima (iako ih se ponekad koristi zajedno s ostatkom biljke). Bobice se također koriste u izradi masti za ozeblina (Maria Treben, 2015) i ljepila za lov ptica (Zvonimir Potočić, 1983). Zanimljiva je i biska, rakija u koju se stavlja imela s drugim travama, karakteristična za Istru. Različiti izvori preporučuju različito vrijeme ubiranja pa se tako prema Gelenčir i Gelenčir (1991) mlade grančice i listovi imele

sabiru u ožujku i travnju te rujnu i listopadu, dok se prema Willfort (1989) listovi ili manje grančice s listovima sabiru od listopada do sredine prosinca, a bobice od studenog do veljače. Danas se imela u tradicionalnoj medicini koristi za liječenje čitavog niza oboljenja, a različita istraživanja su dokazala njezine antibakterijske, antiviralne i protuupalne učinke, njezin utjecaj na imunološki sustav, efekt zaustavljanja staničnih procesa i induciranje stanične smrti (Hajtó i sur., 2005) zbog čega se može iskoristiti kod liječenja raka. Najistraživaniji spojevi imele su različiti lektini (viskumin i dr.) i proteini viskotoksini zbog svoje citotoksičnosti i učinka na stanice raka, no imela je bogata i fenolnim spojevima te pokazuje veliki antioksidacijski kapacitet (Önay-Uçar i sur., 2006) koji se može povezati sa sadržajem tih fenolnih spojeva (Miliauskas i sur., 2004). Sam sastav sekundarnih metabolita, kao i antioksidacijski kapacitet imele ovisi o biljci domaćinu i vremenu ubiranja, pa su tako Vicas i sur. (2011) mjereći antioksidacijski kapacitet imela s 5 različitih domaćina tokom godine u svibnju, srpnju i prosincu utvrdili da imele s različitih domaćina imaju najveće antioksidacijske kapacitete u različito vrijeme. Razlike u sastavu metabolita imela s različitih domaćina mogu se objasniti prijelazom bioaktivnih spojeva iz biljaka domaćina u imelu. Prijelaz alkaloida i fenolnih spojeva s biljaka domaćina na parazitske biljke primjećen u različitim slučajevima (Stermitz, 1998; Adler i sur., 2001; Cabezas i sur., 2009), a na samoj imeli je utvrđen prijenos alkaloida (Boonsong i Wright, 1961).

Biljni materijal se često suši kako bi se sačuvala njegova kvaliteta, jer se smanjivanjem udjela vlage smanjuje i enzimatska i mikrobnost aktivnost (Rocha i sur., 2011). Osim čuvanja kvalitete biljnog materijala sušenjem se smanjuje njegova masa i volumen što olakšava njegovo pohranjivanje i transport (Calixto, 2000). Jedna od metoda sušenja je i liofilizacija kod koje se voda uklanja sublimacijom za razliku od ostalih metoda gdje se voda uglavnom uklanja isparavanjem. Proces liofilizacije počinje zamrzavanjem čime se u uzorku formiraju kristali leda, zatim se tlak smanji ispod 610 Pa te se uzorak polako zagrijava kako bi led sublimirao, pri čemu se tkivo minimalno oštećuje (Fellows, 2016). Liofilizacija se prvo počela koristiti u prehrambenoj industriji kao metoda sušenja koja odlično čuva arome i nutritivnu vrijednost, ali ujedno energetski i ekonomski vrlo skupa. Ova metoda se često koristi za sušenje biljnog materijala kod znanstvenih istraživanja uz pretpostavku da se njome jednako dobro očuvaju i različiti sekundarni metaboliti, što nije uvijek točno te je potrebno provesti opširnija istraživanja i liofilizaciju usporediti s ostalim metodama sušenja (Abascal i sur., 2005).

Kod analiziranja biljnog materijala često mjerimo antioksidacijski i kemijski sastav. Antioksidacijski kapacitet biljnih uzoraka može se mjeriti različitim spektrofotometrijskim metodama. Ove metode se temelje na promjeni boje tokom redukcije poznatih slobodnih radikala u prisutnosti antioksidansa (otopina biljnog uzorka). Kvantitativni kemijski satav također možemo mjeriti spektrofotometrijskim metodama (ma primjer metodom koja koristi Folin-Ciocalteu reagens za mjerenje ukupnih fenola), dok pojedine izabrane spojeve možemo analizirati tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

Tako na primjer kemijskom ili enzimatskom oksidacijom 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline (ABTS) dobivamo ABTS+ radikal plavo-zelene boje, koji dodatkom antioksidansa gubi obojenje što se detektira spektrofotometrijsk pri valnoj duljini od 734 nm. Udjel ABTS radikala koje „gase“ različiti antioksidansi izražava kao funkcija koncentracije i vremena, i mjeri praćenjem smanjenja apsorbancije ABTS-a.

Kod metode koja koristi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) alkoholna otopina radikalnog oblika ovog spoja se u prisutnosti antioksidansa koji služi kao donor atoma vodika ili elektrona reducira. Prijelaz DPPH radikala u neradikalni oblik očituje se promjenom boje iz izrazito ljubičaste u žutu što se detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 515 nm (Radić Brkanac i sur., 2015).

Metoda raduciranja željeznih iona pomoću antioksidansa (FRAP) također je jedna od spektrofotometrijskih metoda koja se koristi za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta. Ona se temelji se na redukciji Fe^{3+} iona u kompleksu Fe(III)-TPTZ (tripiridiltriazin) u Fe^{2+} pri kiselim uvjetima u prisutnosti antioksidansa. Redukcijom Fe^{3+} iona u Fe^{2+} boja reakcijske smjese se mijenja iz žute u plavu što se spektrofotometrijski detektira pri valnoj duljini 593 nm (Benzie i Strain,1999).

Metodom koja se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom koji je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline mjerimo ukupne fenole. Oksidacijom fenola fosfovolframova i fosfomolibdenska kiselina se reduciraju u plavo obojene volfram-oksidi i molibden-oksidi (Ough i Amerine, 1998). Promjena boje iz bezbojne u plavu se detektira spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Zhishen i sur., 1999).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je kromatografska metoda koji se koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje različitih spojeva u otopini. Kod ove metode uzorak se unosi u mobilnu fazu i pod pritiskom putuje kroz kolonu koja je punjena

stacionarnom fazom. Uslijed različitih fizičkih i kemijskih interakcija uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom spojevi iz uzorka se razdvajaju, pa različiti spojevi različitom brzinom prolaze kolonom. Vrijeme potrebno da pojedini spoj dođe do kraja kolone naziva se retencijsko vrijeme i karakteristično je za pojedini spoj. Razdvojeni spojevi protječu kroz UV/Vis detektor koji mjeri apsorpciju svjetla unaprijed određene valne duljine. Kod tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s obrnutim fazama (RP-HPLC) stacionarna faza je nepolarna, a mobilna je polarna, pa do razdvajanja spojeva dolazi uslijed hidrofobnih interakcija. Uzorci se kod HPLC analize fenolnih spojeva podvrgavaju kiselj hidrolizi, kako bi se fenolni spojevi vezani za šećere “oslobodili”; bez hidrolize postoji mogućnost da se pojedini fenolni spoj očita dva puta, jednom kao slobodan i jednom vezan za šećer (Antolovich, 2000).

Cilj ovog rada je utvrditi razlike u antioksidacijskom kapacitetu, količini ukupnih fenola te prisutnosti i količini odabranih fenolnih spojeva između ekstrakta imele kod kojih je biljni materijal liofiliziran i onih kod kojih je biljni materijal sušen na sobnoj temperaturi. Za mjerenje antioksidacijskog kapaciteta koristit će se tri spektrofotometrijske metode, za mjerenje ukupnih fenola koristit će se reakcija s Folin-Ciocalteu reagensom, a za utvrđivanje nazočnosti pojedinih fenolnih spojeva koristit će se RP-HPLC metoda.

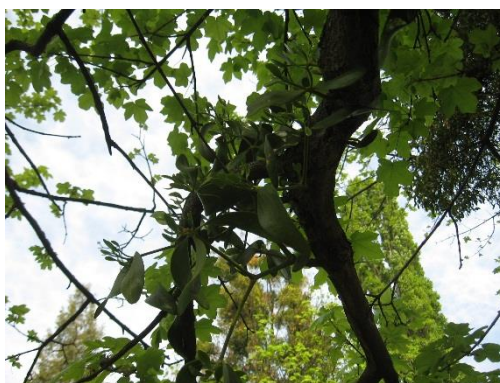
Hipoteza diplomskog rada:

Liofilizirani uzorci imele će pokazati veći antioksidacijski kapacitet, veću količinu ukupnih fenola kao i veće količine pojedinih fenolnih spojeva od onih u uzorcima imele sušene na sobnoj temperaturi.

2. Materijali i metode

2.1. Biljni materijal

Lišće imele (*Viscum album* L.) je skupljeno u Zagrebu sa stabla javora (*Acer campestre* L.) (Slika 1) i gloga (*Crataegus monogyna* Jacq.) koji su rasli na površini u sklopu Studentskog doma Laščina gdje postoji veći broj stabala zaraženih imelom, i s osamljenog stabla lipe (*Tilia platyphyllos* Scop.) između parkirnih mjesta nedaleko parka Maksimir. Biljni materijal je sakupljen sredinom travnja 2017. godine s najnižih grana i sa samo jedne imele na svakom stablu zbog jednostavnosti i nemogućnosti pristupa višim granama. Biljni materijal sakupljen s pojedine imele je podijeljen na dva dijela, od kojih je jedan dio sušena u sjeni i na sobnoj temperaturi dok je drugi dio liofilizirana.



Slika 1. Imela na javoru, Laščina

2.2 Metode

2.2.1. Priprema ekstrakta

Liofilizirani i na sobnoj temperaturi sušeni listovi imele s peteljka usitnjeni su u komadiće promjera približno 5 mm (Slika 2). Na dno staklene kolone dimenzije 1×10 cm stavljena je vata i na nju 2 g biljnog materijala, koji je potom prekriven vatom i doliven je 80%-tni metanol tako da prekrije čitav biljni materijal (10 ml) (Slika 3). Tako napunjena kolona je omotana aluminijskom folijom. Nakon perioda od 24 h perkolat se ispušta iz kolone brzinom od oko 4 kapi u minuti. Tako dobiveni perkolat je uparavan na aparatu Rotavapor na temperaturi od 30 °C dok metanol i voda nisu u potpunosti isparili. U tako dobivenu suhu tvar je dodano 2 ml 80%-tnog metanola čime je dobiven ekstrakt s omjerom suhe biljne mase i otapala 1:1 (1000 g/l).



Slika 2. Usitnjeni biljni materijal



Slika 3. Kolona s biljnim materijalom

2.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidacijski kapacitet uzoraka imele je određen spektrofotometrijskim metodama ABTS, DPPH i FRAP. Kod mjerenja napravljene su tri tehnička ponavljanja.

2.2.2.1. Metoda ABTS

Za pripremu otopine ABTS+ radikala korištena je 7 mM otopina ABTS-a oksidirana sa svježe pripremljenom 140 mM otopinom kalijevog peroksidisulfata do konačne koncentracije kalijevog peroksidisulfata 2,45 mM. Na dan analize otopinu ABTS+ radikala razrijedimo 96%-tnim etanolom do konačne koncentracije od 1%. Tako pripremljenu otopinu ABTS+ radikala volumena 2 mL se pomiješa s 10 μ L uzorka, te se nakon točno 6 minuta mjeri apsorbancija na 740 nm. Za referentno mjerenje je korišteno 2 mL 96%-tnog etanola i 10 μ L 80%-tnog metanola, dok je kao kontrola korišteno 2 mL otopine ABTS+ radikala i 10 μ L 80%-tnog metanola. Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti metodom ABTS koristio sam protokol prema Re i sur. (1999) s malim izmjenama.

Postotak inhibicije ABTS radikala izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

A_0 -apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t -apsorbancija uzorka (sa ekstraktom).

2.2.2.2. Metoda DPPH

Svježe pripremljena otopina DPPH u etanolu koncentracije 0.1 mM i volumena 950 μ L pomiješana je s 50 μ L uzorka, a dobivena smjesa je ostavljena da se inkubira na sobnoj temperaturi 30 min. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 520 nm. Za referentno mjerenje je korišteno 950 μ L 96%-tnog etanola i 50 μ L 80%-tnog metanola, dok je kao kontrola korišteno 950 μ L 0.1 mM otopine DPPH i 50 μ L 80%-tnog metanola. Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH koristio sam protokol prema Radić Brkanac i sur. (2015) s malim izmjenama.

Postotak inhibicije DPPH radikala izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

A_0 -apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

A_t -apsorbancija uzorka (sa ekstraktom)

2.2.2.3. Metoda FRAP

FRAP reagens se priprema miješanjem acetatnog pufera (300 mM; pH 3,6), otopine TPTZ (10 mM u 40 mM kloridnoj kiselini) te željezo (II) klorida (20 mM) u omjeru 10:1:1. Pripremljeni FRAP reagens zagrijan na 37 °C volumena 950 μ L se pomiješa s 50 μ L uzorka. Apsorbancija

je mjerena 4 min nakon miješanja pri valnoj duljini od 595 nm. Za referentno mjerenje korišteno 950 µL FRAP reagensa bez TPTZ-a i 50 µL 80%-tnog metanola, dok je kao kontrola korišteno 950 µL FRAP reagensa i 50 µL 80%-tnog metanola. Za mjerenje antioksidacijske aktivnosti metodom DPPH koristio sam protokol prema Benzie i Strain (1999) s malim izmjenama.

Postotak redukcije Fe^{3+} - TPTZ izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{A_t - A_0}{A_t} \times 100$$

A_0 -apsorbancija kontrole (bez ekstrakta)

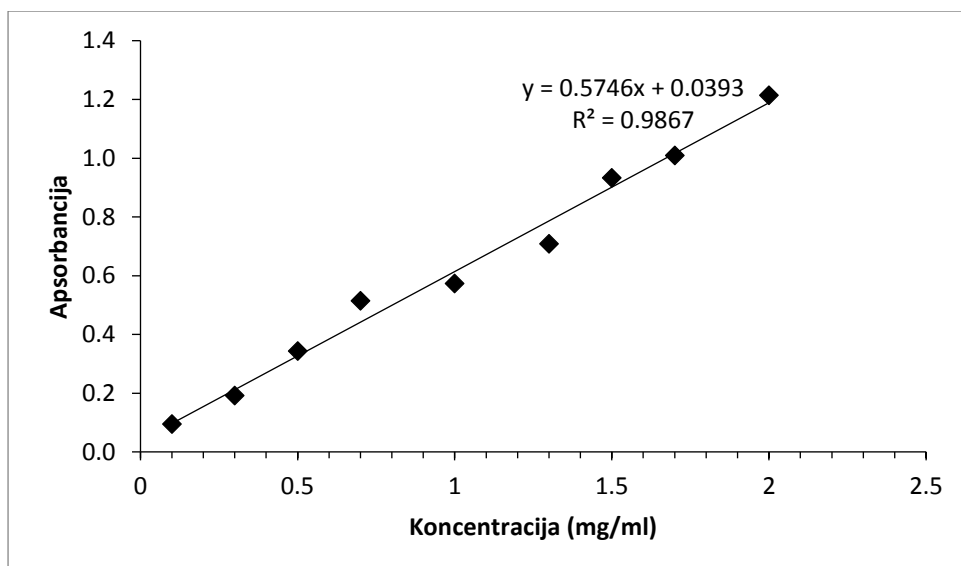
A_t -apsorbancija uzorka (sa ekstraktom).

2.2.3. Kvantitativna i kvalitativna analiza fenolnih spojeva

Ukupni fenoli u uzorcima su određeni pomoću Folin-Ciocalteu reagensa dok su pojedini fenolni spojevi detektirani RP-HPLC metodom. Kod mjerenja napravljena su tri tehnička ponavljanja.

2.2.3.1. Mjerenje ukupnih fenola

Uzorak volumena 2 µl pomiješa se s 10 µl Folin-Ciocalteu reagensa i 158 µl deionizirane vode. Nakon miješanja dodaje se 30 µl 1,88 M Na_2CO_3 , ponovno promiješa i ostavi inkubirati u vodenoj kupelji 30 min na 45 °C. Nakon inkubacije mjerimo apsorbanciju na valnoj duljini od 765 nm. Za izradu baždarnog pravca korištene su metanolne otopine galne kiseline poznatih koncentracija (Slika 4).



Slika 4. Baždarni pravac izrađen je pomoću apsorbancija poznatih koncentracija galne kiseline pri valnoj duljini $\lambda=765$ nm

2.2.3.2. RP-HPLC metoda

Pojedini fenolni spojevi su detektirani i kvantificirani pomoću Agilent 1100 Series sistema. Korištena je kolona Poroshell 120 SB-C18, dimenzije 4.6×75 mm, veličine pora 2.7 μm i predkolona Zorbax SB-C18, dimenzije 4.6×12.5 mm, veličine pora 5 μm . Profil gradijenta za razdvajanje fenolnih spojeva formiran je prema Fuentes-Alventosa i sur. (2007) pomoću otapala A [10% (v/v) vodena otopina acetonitrila plus 2 ml/l ledene octene kiseline] i otapala B [40% acetonitril, 40% metanol, 20% H_2O uz dodatak 2 ml/l octene kiseline]. Omjer otapala A i B u profilu gradijenta bio je: 90/10 u nultoj minuti, 57.5/42.5 u 17. min, 43.5/56.5 od 20. min, 0/100 u 22. min, 0/100 u 27. min and 90/10 u 30. min. Unešeni volumen iznosio je 25 μl , brzina protoka iznosila je 1.0 ml/min, a temperatura kolone iznosila je 30 °C. UV/Vis detektor je bio namješten na valnu duljinu od 360 nm za flavonoide i na valnu duljinu od 310 nm za fenolne kiseline. Fenolni spojevi su određeni prema svojim retencijskim vremenima i usporedbom njihova UV spektra s onim poznatih standarda. Biljni ekstrakti su uspoređeni sa slijedećim standardima fenolnih spojeva: *p*-kumarinska kiselina, kvercetin, kemferol, izoramentin, galna kiselina, klorogena kiselina, kavena kiselina, ferulična kiselina, sinapilna kiselina i salicilna kiselina. Za potrebe ove analize uzorci su razrijeđeni do konačne koncentracije 10 g/l i hidrolizirani na način da se u 300 μl tako razrijeđenog uzorka dodalo 1.2 M HCl, nakon čega su inkubirani 2 h na 80 °C i 300 rpm. Dobivene otopine su tri puta

centrifugirane po 5 min pri 13000 rpm nakon čega su supernatanti do analize pohranjeni na -20 °C.

2.2.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvedena je pomoću računalnog programa STATISTICA 12.0 (Stat Soft Inc., SAD). Usporedba provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te primjenom "Duncan's New Multiple Range Test" (DNMRT), tj. post hoc testa višestrukih usporedbi. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini $P \leq 0.05$.

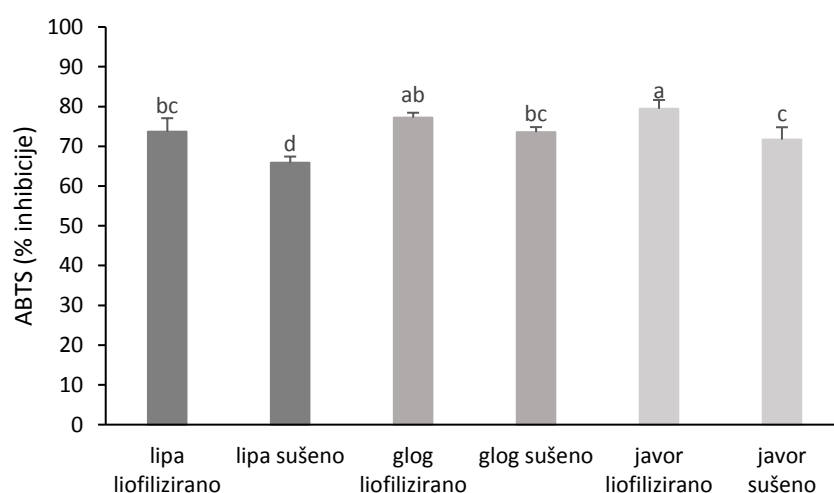
3. Rezultati

3.1. Antioksidacijski kapacitet

Antioksidacijski kapacitet metanolnih ekstrakata lišća s peteljka imele (*Viscum album* L.) mjereni su spektrofotometrijskim metodama ABTS, DPPH i FRAP.

3.1.1. ABTS metoda

Uzorak liofilizirane imele koja je rasla na javoru je pokazao najveći antioksidacijski kapacitet (79.43% inhibicije), dok je uzorak na sobnoj temperaturi sušene imele koja je rasla na lipi pokazao najmanji antioksidacijski kapacitet (65.87% inhibicije). Svi liofilizirani uzorci su pokazali statistički značajno veći antioksidacijski kapacitet od svojih parova sušenih na sobnoj temperaturi. Postotci inhibicije svakog od uzoraka su bili veći od 60% (Slika 5).

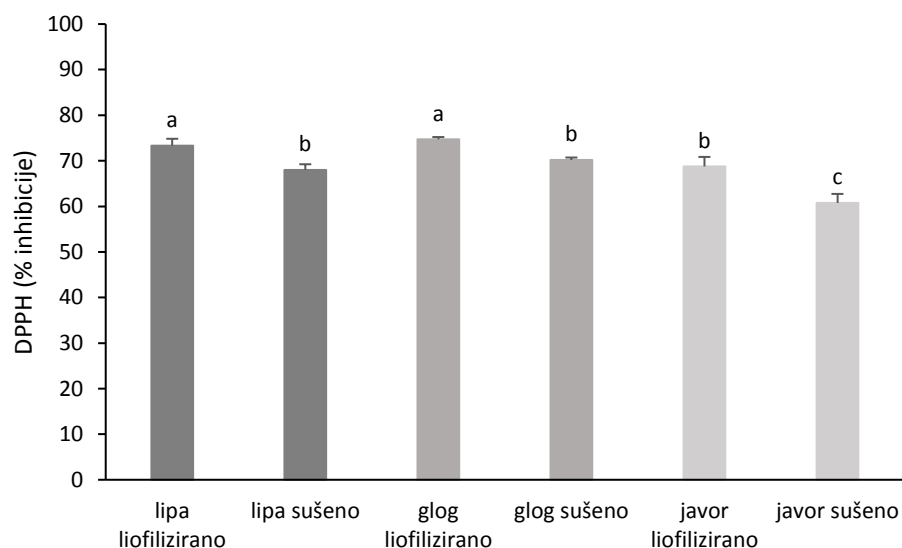


Slika 5. Antioksidacijski kapacitet sušenih i liofiliziranih uzoraka imela koje su rasle na različitim domaćinima mjerjen metodom ABTS (% inhibicije). Statistički značajno različite vrijednosti ($P \leq 0.05$) označene su različitim slovima.

3.1.2. DPPH metoda

Uzorci liofiliziranih imela koje su rasle na lipi i glogu su pokazali najveći antioksidacijski kapacitet (redom 73.31% i 74.71% inhibicije), dok je najmanji antioksidacijski kapacitet pokazao uzorak na sobnoj temperaturi sušene imele koja je rasla na javoru (60.75% inhibicije).

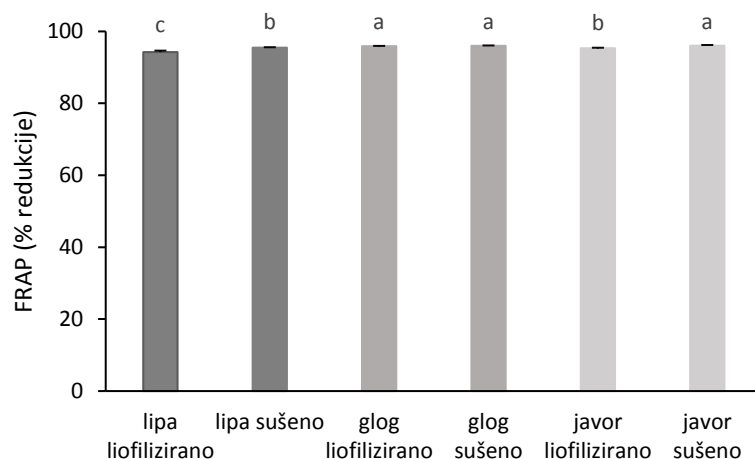
Svi liofilizirani uzorci su pokazali statistički značajno veći antioksidacijski kapacitet od svojih parova sušenih na sobnoj temperaturi. Postotci inhibicije svakog od uzoraka su bili veći od 60% (Slika 6).



Slika 6. Antioksidacijski kapacitet sušenih i liofiliziranih uzoraka imela koje su rasle na različitim domaćinima mjeren metodom DPPH (% inhibicije). Statistički značajno različite vrijednosti ($P \leq 0.05$) označene su različitim slovima.

3.1.3. FRAP metoda

Uzorak liofilizirane imele koja je rasla na glogu te na sobnoj temperaturi sušeni uzorci imela koje su rasle na glogu i javoru su pokazali najveći antioksidacijski kapacitet (redom 95.9%, 96.01% i 96.03% redukcije), dok je najmanji antioksidacijski kapacitet pokazao uzorak liofilizirane imele koja je rasla na lipi (94.25% redukcije). Liofilizirani uzorci imele koja je rasla na lipi i javoru su pokazali statistički značajno manji antioksidacijski kapacitet (redom 94.25% i 95.33% redukcije) od svojih parova koji su sušeni na sobnoj temperaturi (redom 95.49% i 96.03% redukcije), dok su liofilizirani i na sobnoj temperaturi sušeni uzorci imele koja je rasla na glogu pokazali približno jednaki antioksidacijski kapacitet (redom 95.9% i 96% redukcije). Postotci inhibicije svakog od uzoraka su bili veći od 80% (Slika 7).



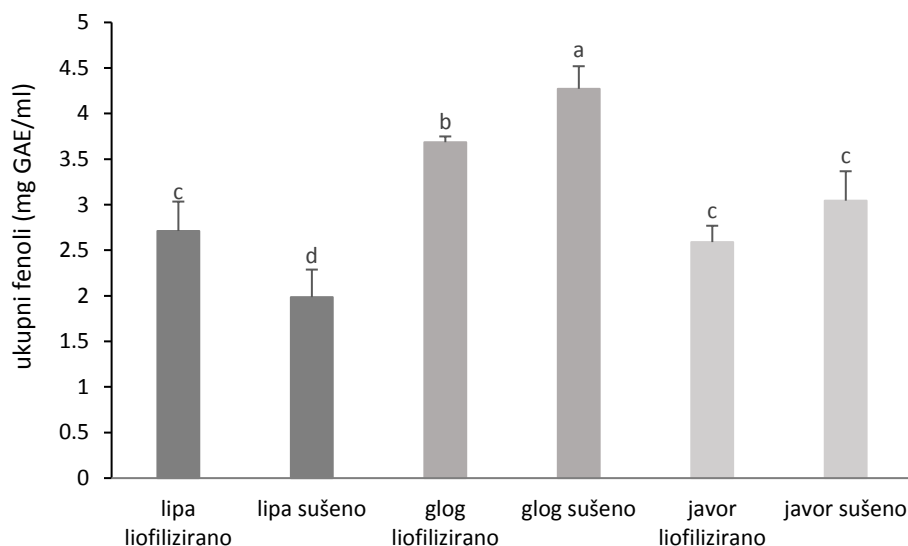
Slika 7. Antioksidacijski kapacitet sušenih i liofiliziranih uzoraka imela koje su rasle na različitim domaćinima mjereno metodom FRAP (% redukcije). Statistički značajno različite vrijednosti ($P \leq 0.05$) označene su različitim slovima.

3.2. Kvantitativna i kvalitativna analiza fenolnih spojeva

Ukupni fenoli metanolnih ekstrakata lišća s peteljka imele (*Viscum album* L.) određeni su pomoću Folin-Ciocalteu reagensa dok su pojedini fenolni spojevi detektirani RP-HPLC metodom.

3.2.1. Mjerenje ukupnih fenola

Rezultati mjerenja ukupnih fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa prikazani su na Slici 8, a izraženi su kao ekvivalent galne kiseline. Najveća količina ukupnih fenola izmjerena je u uzorku na sobnoj temperaturi sušene imele koja je rasla na glogu (4.27 mg GAE/ml), dok je najmanja količinu ukupnih fenola izmjerena u uzorku na sobnoj temperaturi sušene imele koja je rasla na lipi (1.99 mg GAE/ml). U uzorku liofilizirane imele koja je rasla na lipi izmjereno je statistički značajno veća količina ukupnih fenola (2.71 mg GAE/ml) od one izmjere u njezinom na sobnoj temperaturi sušenom paru (1.99 mg GAE/ml). U uzorku liofilizirane imele koja je rasla na glogu izmjereno je statistički značajno manja količina ukupnih fenola (3.69 mg GAE/ml) od one izmjere u njezinom na sobnoj temperaturi sušenom paru (4.27 mg GAE/ml). U uzorcima liofilizirane i na sobnoj temperaturi sušene imele koja je rasla na javoru su izmjerene približno jednake količine ukupnih fenola (2.59 mg GAE/ml i 3.04 mg GAE/ml).



Slika 8. Ukupni fenolni spojevi u sušenim i liofiliziranim uzorcima imela koje su rasle na različitim domaćinima (ekvivalent u mg galne kiseline). Statistički značajno različite vrijednosti ($P \leq 0.05$) označene su različitim slovima.

3.2.2. Mjerenje pojedinačnih fenolnih spojeva RP-HPLC metodom

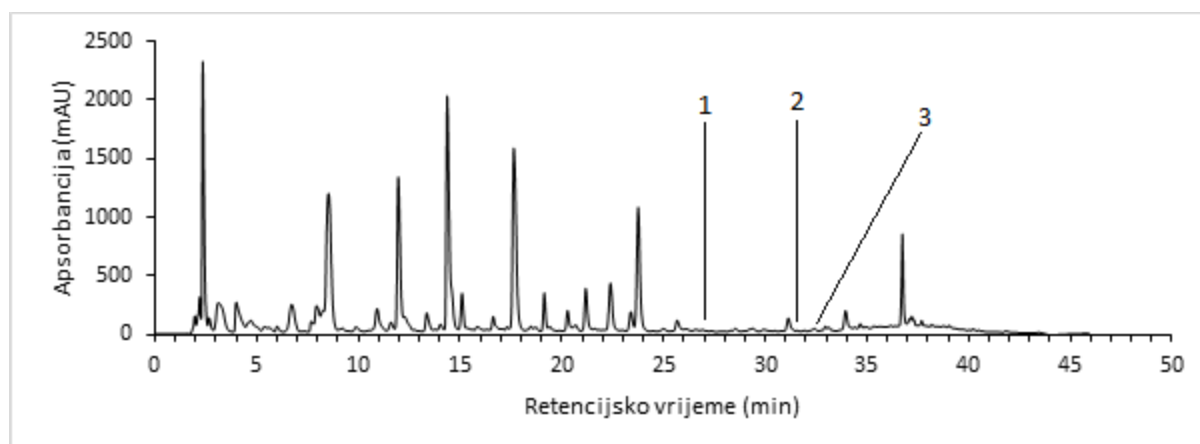
HPLC analizom uzoraka listova imele detektirano je ukupno 9 fenolnih spojeva. Kod valne duljine $\lambda=360$ nm (Slika 9) mjereni su kvercetin s retencijskim vremenom $R_t=27$ min, kempferol s retencijskim vremenom $R_t=31.6$ min i isorhamentin s retencijskim vremenom $R_t=32.5$ min. . Kod valne duljine $\lambda=310$ nm (Slika 10) mjerene su kloragena kiselina s retencijskim vremenom $R_t=8$ min, kavena kiselina s retencijskim vremenom $R_t=9$ min, *p*-kumarinska kiselina s retencijskim vremenom $R_t=12.7$ min, salicilna kiselina s retencijskim vremenom $R_t=14.8$ min i sinapilna kiselina s retencijskim vremenom $R_t=15.7$ min. Kod valne duljine $\lambda=280$ nm (Slika 11) mjerena je galna kiselina s retencijskim vremenom $R_t=2.7$ min.

HPLC analizom kiselinom hidroliziranih uzorka listova imele koja je rasla na lipi identificirano je 9 fenolnih spojeva (Slika 12), od toga 6 fenolnih kiselina (*p*-kumarinska, galna, kavena, ferulična, sinapilna i salicilna kiselina) i 3 flavonoida (kvercetin, kempferol i isoramentin). Izmjerene količine *p*-kumarinske kiseline, kvercetina i sinapilne kiseline u liofiliziranom uzorku statistički su značajno veće od onih izmjerenih u uzorku sušenom na sobnoj temperaturi. Izmjerene količine isoramentina, galne kiseline i kavene kiseline u liofiliziranom uzorku neznatno su veće od onih izmjerenih u uzorku sušenom na sobnoj

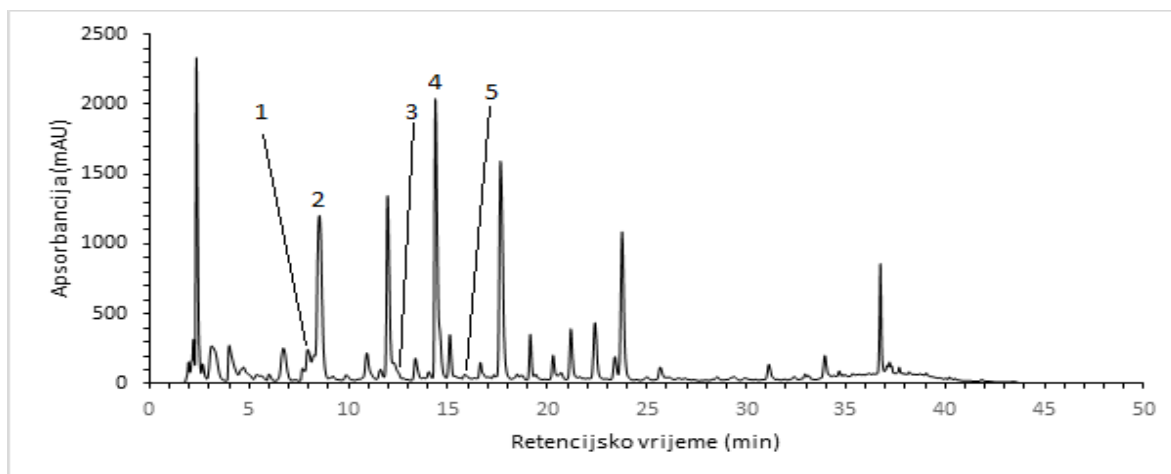
temperaturi. Izmjerene količine kempferola, ferulične kiseline i salicilne kiseline približno su jednake u oba uzorka.

HPLC analizom kiselinom hidroliziranih uzorka imele koja je rasla na glogu identificirano je 10 fenolnih spojeva (Slika 13), od toga 7 fenolnih kiselina (*p*-kumarinska, galna, klorogenska, kavena, ferulična, sinapilna i salicilna kiselina) i 3 flavonoida (kvercetin, kempferol i isoramentin). Izmjerena količina *p*-kumarinske kiseline u liofiliziranom uzorku statistički je značajno veća od one izmjerene u uzorku sušenom na sobnoj temperaturi. Izmjerene količine kvercetina, klorogenske kiseline i sinapilne kiseline u liofiliziranom uzorku statistički su veće od onih izmjerenih u uzorku sušenom na sobnoj temperaturi. Izmjerena količina isoramentina u uzorku na sobnoj temperaturi sušene imele je statistički veća od one u liofiliziranom uzorku. Izmjerene količine kempferola, galne kiseline, kavene kiseline, ferulične kiseline i salicilne kiseline približno su jednake u oba uzorka.

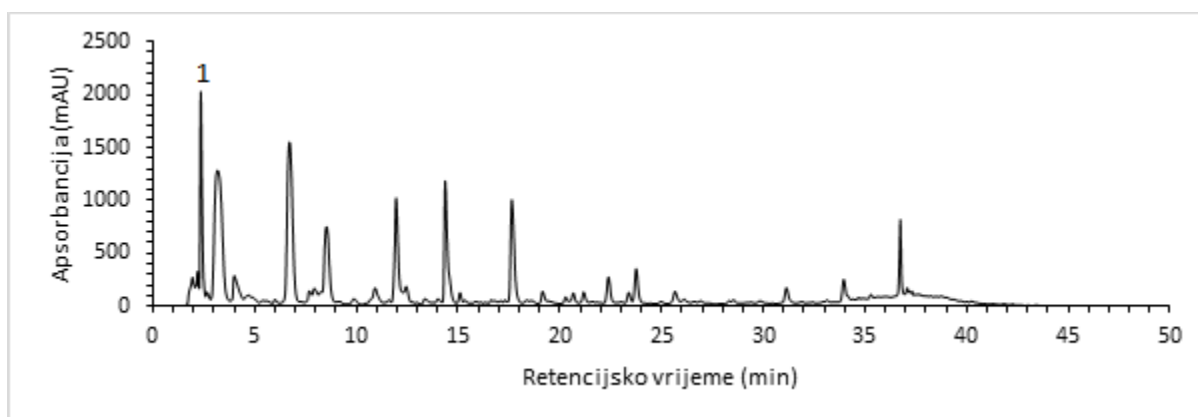
HPLC analizom kiselinom hidroliziranih uzorka imele koja je rasla na javoru identificirano je 8 fenolnih spojeva (Slika 14), od toga 5 fenolnih kiselina (*p*-kumarinska, kavena, ferulična, sinapilna i salicilna kiselina) i 3 flavonoida (kvercetin, kempferol i isoramentin). Izmjerene količine *p*-kumarinske kiseline i sinapilne kiseline u liofiliziranom uzorku statistički su značajno veće od onih izmjerenih u uzorku sušenom na sobnoj temperaturi. Izmjerena količina kavene kiseline u liofiliziranom uzorku statistički je veća od one izmjerene u uzorku sušenom na sobnoj temperaturi. Izmjerene količine kvercetina, kempferola, ferulične kiseline i salicilne kiseline izmjerene u uzorku na sobnoj temperaturi sušene imele statistički su veće od onih u liofiliziranom uzorku. Izmjerene količine isoramentina i salicilne kiseline približno su jednake u oba uzorka.



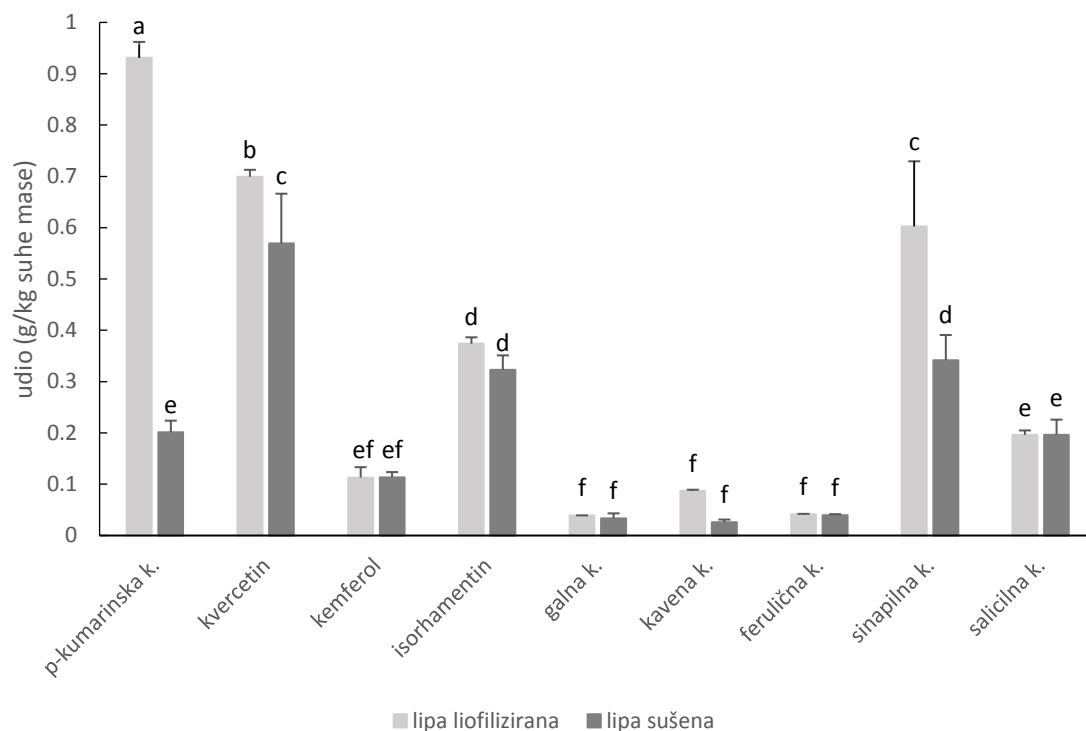
Slika 9. Kromatogram liofiliziranog uzorka imele koja je rasla na lipi pri valnoj duljini $\lambda=360$ nm; (1) kvercetin, (2) kempferol i (3) isorhamentin



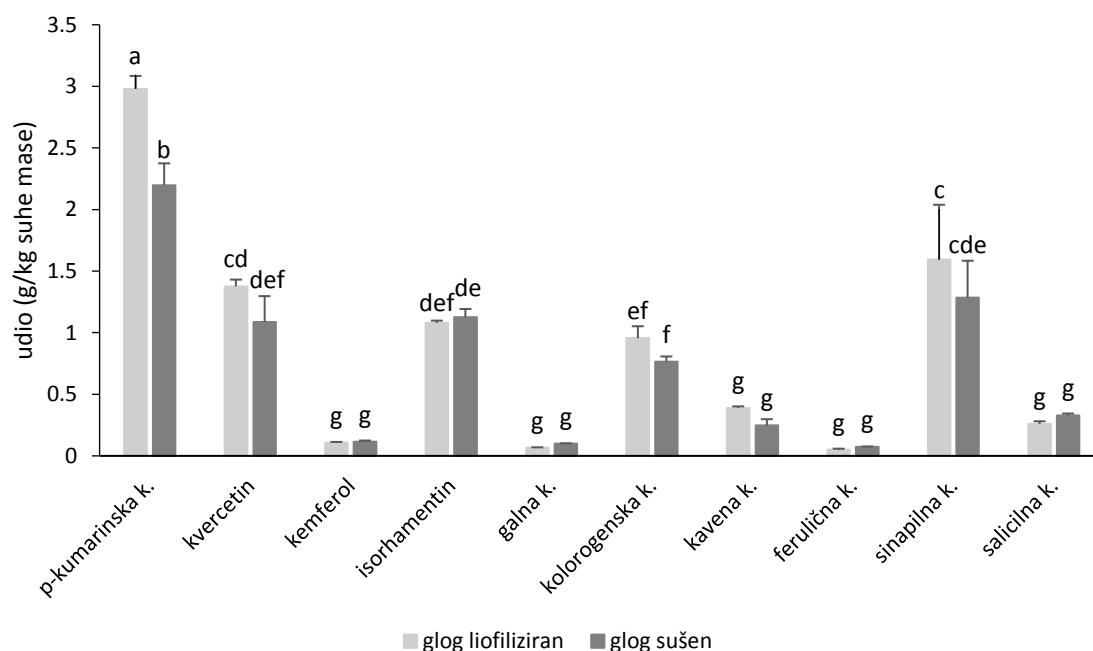
Slika 10. Kromatogram liofiliziranog uzorka imele koja je rasla na lipi pri valnoj duljini $\lambda=310$ nm; (1) kloragena k., (2) kavena k., (3) *p*-kumarinska k., (4) salicilna k. i (5) sinapilna k.



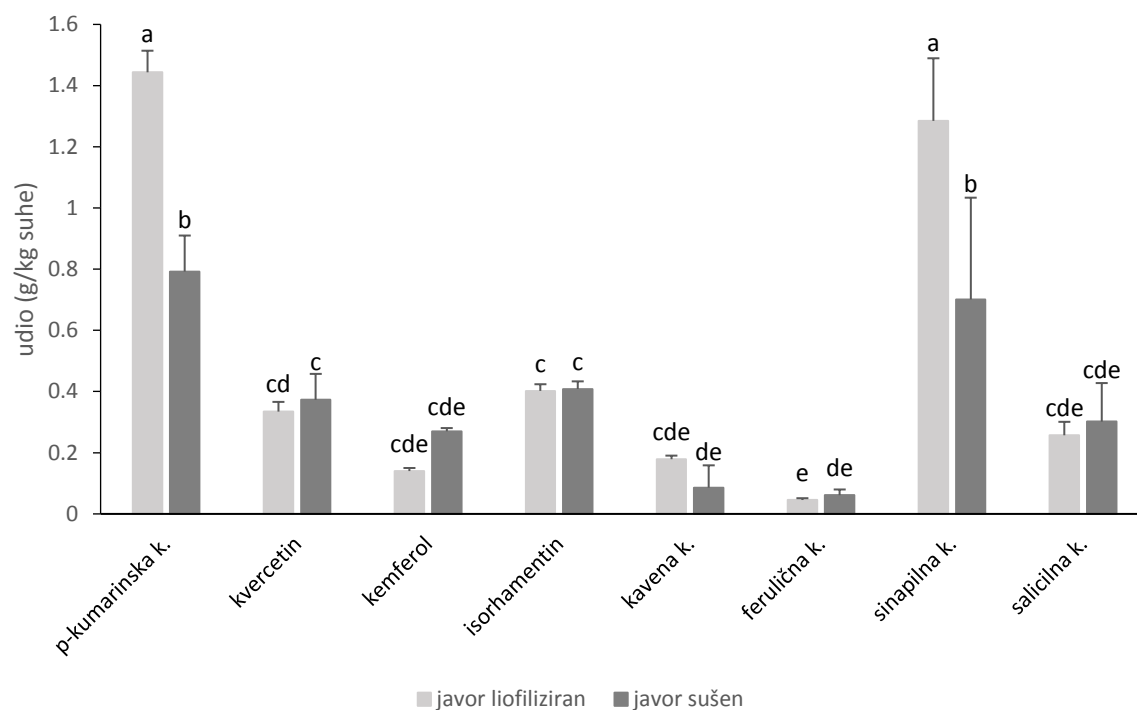
Slika 11. Kromatogram liofiliziranog uzorka imele koja je rasla na lipi pri valnoj duljini $\lambda=280$ nm; (1) galna kiselina



Slika 12. Usporedba mjerenih fenolnih spojeva kod liofiliziranih i sušenih uzoraka imele koja je rasla na lipi. Statistički značajno različite vrijednosti ($P \leq 0.05$) označene su različitim slovima.



Slika 13. Usporedba mjerenih fenolnih spojeva kod liofiliziranih i sušenih uzoraka imele koja je rasla na glogu. Statistički značajno različite vrijednosti ($P \leq 0.05$) označene su različitim slovima.



Slika 14. Usporedba mjerenih fenolnih spojeva kod liofiliziranih i sušenih uzoraka imele koja je rasla na javoru. Statistički značajno različite vrijednosti ($P \leq 0.05$) označene su različitim slovima.

4. Rasprava

Antioksidacijski kapaciteti svih liofiliziranih uzoraka mjereni ABTS metodom su bili veći od njihovih na sobnoj temperaturi sušenih parova, od čega su liofilizirani uzorak imele koja je rasla na lipi i liofilizirani uzorak imele koja je rasla na javoru bili statistički značajno veći. Svi uzorci su pokazali jak antioksidacijski kapacitet (70% inhibicije) osim uzorka na sobnoj temperaturi sušene imele koja je rasla na lipi koji je pokazao umjeren antioksidacijski kapacitet (40%-70% inhibicije slobodnih radikala). Prema Vujcic i sur. (2017) za uzorke s postotkom inhibicije slobodnih radikala većim od 70% se smatra da imaju jak antioksidacijski kapacitet, za uzorke s postotkom inhibicije slobodnih radikala između 40% i 70% se smatra da imaju umjeren antioksidacijski kapacitet, a one s postotkom inhibicije ispod 40% se smatra da imaju slab antioksidacijski kapacitet.

Antioksidacijski kapaciteti svih liofiliziranih uzoraka mjereni DPPH metodom su bili statistički značajno veći od njihovih na sobnoj temperaturi sušenih parova. Liofilizirani uzorci imela koje su rasle na lipi i glogu su pokazali jak antioksidacijski kapacitet (70% inhibicije), dok su ostali uzorci pokazali umjeren antioksidacijski kapacitet (40%-70% inhibicije)

Antioksidacijski kapaciteti liofiliziranih uzoraka lipe i javora mjereni FRAP metodom bili su statistički značajno niži od svojih na sobnoj temperaturi sušenih parova, dok su i liofilizirani i na sobnoj temperaturi uzorak imele koja je rasla na glogu imali statistički približno jednake antioksidacijske kapacitete.

Mjerenja i ABTS i DPPH metodom su pokazala kao liofilizirani uzorci imaju veći antioksidacijski kapacitet od svojih na sobnoj temperaturi sušenih parova, dok kod mjerenja FRAP metodom to nije tako (liofilizirani uzorci imele koja je rasla na lipi i javoru imali su manji antioksidacijski kapacitet od svojih na sobnoj temperaturi sušenih parova, dok su i liofilizirani uzorak imele koja je rasla na glogu i na sobnoj temperaturi sušeni uzorak imele koja je rasla na glogu imali približno isti antioksidacijski kapacitet). Tomu bi razlog mogao biti to što se kod FRAP metode antioksidacijski kapacitet mjeri nakon 4 minute nakon miješanja reagensa i uzorka, no različiti spojevi reagiraju različitom brzinom, a reakcija se nastavlja i nakon te 4 minute (Amorati i Valgimigli, 2015), pa je moguće da u pojedinim uzorcima neki spojevi s antioksidacijskim svojstvima nisu završili reakciju ili uopće nisu reagirali s reagensom.

Uzorci imele s gloga su generalno pokazali najveći antioksidacijski kapacitet. Ovo se može objasniti prijelazom fenolnih spojeva iz biljke domaćina u imelu. Naime, glog je bogat različitim fenolnim spojevima i u narodnoj medicini se koristi za liječenje bolesti srca i regulaciju visokog tlaka (Phalow, 1989), a imela uz vodu i mineralne tvari iz biljke domaćina preuzima i različite sekundarne metabolite, pa tako i fenolne spojeve slučajevima (Stermitz, 1998; Adler i sur., 2001; Cabezas i sur., 2009).

Nema istraživanja antioksidacijskog kapaciteta imela s domaćina koji su se koristili u ovom radu, kao ni istraživanja antioksidacijskog kapaciteta imela čiji se ekstrakt priređivao u 80% metanolu. U radu Vicaș i sur. (2011) u kojem su se uspoređivali antioksidacijski kapaciteti etanolnih ekstrakata imela sabiranih tokom godine u svibnju, srpnju i prosincu s pet različitih domaćina utvrđeno je da svi uzorci tokom cijele godine imaju umjeren antioksidacijski kapacitet (40%-70% inhibicije) osim uzorka sabranog u srpnju sa stabla jasena koji je pokazao jak antioksidacijski kapacitet (77.19%). Rezlike među rezultatima tog rada i ovog mogu se pripisati različitom vremenu ubiranja (svibanj, srpanj i prosinac naspram travnja), korištenjem različitih otapala (etanol naspram metanola), razlikama među imelama koje su rasle na različitim domaćinima ili različitim ekološkim uvjetima na različitim lokalitetima (ruralni dio Rumunjske naspram Zagreba).

Liofilizirani uzorak imele koja je rasla na lipi je jedini pokazao veće koncentracije ukupnih fenola od svojeg na sobnoj temperaturi sušenog para, liofilizirani i na sobnoj temperaturi sušeni uzorci imele koja je rasla na javoru pokazali su približno jednake koncentracije ukupnih fenola, dok je liofilizirani uzorak imele koja je rasla na glogu pokazao manje koncentracije ukupnih fenola od svojeg na sobnoj temperaturi sušenog para. Liofilizacijom biljnog materijala dobro se čuvaju tanini velike molekularne mase, ali utjecaj na ostale fenolne spojeve varira (Abascal i sur., 2005), pa bi se raznoliki rezultati koncentracije ukupnih fenola mogli biti uzrokovani razlikama u fenolnom sastavu različitih imela koje su rasle na različitim domaćinima (različite imele imaju više ili manje fenolnih spojeva na čije očuvanje liofilizacija bolje ili lošije djeluje).

HPLC analizom uzoraka listova imele detektirano je ukupno 9 fenolnih spojeva, a od toga 6 fenolnih kiselina (*p*-kumarinska, galna, kavena, ferulična, sinapilna i salicilna kiselina) i 3 flavonoida (kvercetin, kempferol i isoramentin). U liofiliziranim uzorcima su se pojedini fenolni spojevi (oni čije su koncentracije u uzorcima bile najviše) bolje sačuvali nego u njihovima na sobnoj temperaturi sušenim parovima: kvercetin, *p*-kumarinska i sinapilna

kiselina kod uzorka imele koja je rasla na lipi; *p*-kumarinska kiselina kod uzorka imele koja je rasla na glogu; *p*-kumarinska i sinapilna kiselina kod uzorka imele koja je rasla na javoru. Koncentracije ostalih detektiranih spojeva su približno jednake i kod liofiliziranih i kod na sobnoj temperaturi sušenih uzoraka. Nema literaturnih podataka koji bi pokazali kako sušenje biljnog materijala na zraku i liofilizacija utječu na *p*-kumarinsku i sinapilnu kiselinu koje su se u ovom radu pokazale stabilnijima u liofiliziranom materijalu od onog u sušenog na zraku, pa bi se liofilizacija biljnog materijala mogla primjenjivati kada se želi zadržati što viša koncentracija tih fenolnih kiselina. Koncentracije pojedinih spojeva su najveće u uzorcima gloga što odgovara i rezultatima analize ukupnih fenola gdje i liofilizirani i na sobnoj temperaturi sušeni uzorci imele koja je rasla na glogu imaju znatno veće koncentracije ukupnih fenola od ostalih uzoraka. Ovo se može pripisati prijelazu fenolnih spojeva kojima je glog inače bogat u imelu (Stermitz, 1998; Adler i sur., 2001; Cabezas i sur., 2009).

Ne postoje radovi koji su proveli HPLC analizu fenolnih spojeva uzoraka imele s različitih domaćina koji su koristili imele s istih domaćina kao u ovom radu. U radu Luczkiewicz i sur. (2001) provedena je HPLC analiza fenolnih kiselina uzoraka imele sa 6 različitih domaćina od kojih je jedan i *Acer platanoides* L. koji je filogenetski srodan vrsti *Acer campestre* L., pa bi se moglo usporediti podatke tih dvaju uzoraka. U ovom radu u imeli koja je rasla na javoru *Acer campestre* L. detektirane su *p*-kumarinska, kavena, ferulična, sinapilne i salicilna kiselina. U radu Luczkiewicz i sur. (2001) detektirane su sve ove kiseline bez sinapilne kiseline, uz kloragensku, elagičnu, galnu i siringičnu kiselinu te još neke kiseline koje ja nisam utvrđivao (trans-cimetnu, *p*-hidroksibenzojevu i protokatehinski kiselinu). Ove razlike bi se mogle pripisati razlikama u odabiru otapala kao i razlikama u fenolnom sastavu među vrstama unutar istog roda.

5. Zaključak

Liofilizirani uzorci su generalno pokazali veće vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na svoje u sjeni i na sobnoj temperaturi sušenim parovima, kao i veće koncentracije *p*-kumarinske i sinapilne kiseline. Imela koja je rasla na glogu bogatija je fenolnim tvarima u usporedbi s onima raslim na lipi i javoru. U cjelini gledajući uzorci imele s gloga pokazuju i veći antioksidacijski kapacitet u usporedbi s ostalim uzorcima

6. Literatura

Abascal, K., Ganora, L., & Yarnell, E. (2005). The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(8), 655-660.

Adler, L. S., Karban, R., & Strauss, S. Y. (2001). Direct and indirect effects of alkaloids on plant fitness via herbivory and pollination. *Ecology*, 82(7), 2032-2044.

Ali, A., Chong, C. H., Mah, S. H., Abdullah, L. C., Choong, T. S. Y., & Chua, B. L. (2018). Impact of storage conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried piper betle extracts. *Molecules*, 23(2), 484.

Amorati, R., & Valgimigli, L. (2015). Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free radical research*, 49(5), 633-649.

Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125(5), 989-1009.

Benzie, Iris FF, and J. J. Strain. "[2] Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration." *Methods in enzymology*. Vol. 299. Academic Press, 1999. 15-27.

Blomhoff, R. (2010): Role of dietary phytochemicals in oxidative stress. U: Bernhoft, A., Siem, H., Bjertness, E., Meltzer, M., Flaten, T., & Holmsen, E. (ur.) *Bioactive compounds in plants—benefits and risks for man and animals*. The Norwegian Academy of Science and Letters. Oslo, Novus forlag, str. 52-71.

Boonsong, C., & Wright, S. E. (1961). The cardiac glycosides present in mistletoes growing on *Nerium oleander*. *Australian Journal of Chemistry*, 14(3), 449-457.

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.J. (2015) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

- Cabezas, N. J., Urzúa, A. M., & Niemeyer, H. M. (2009). Translocation of isoquinoline alkaloids to the hemiparasite, *Tristerix verticillatus* from its host, *Berberis montana*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(3), 225-227.
- Calixto, J. B. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of medical and Biological research*, 33(2), 179-189.
- Couteau, D., McCartney, A. L., Gibson, G. R., Williamson, G., & Faulds, C. B. (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of applied microbiology*, 90(6), 873-881.
- Dewick, P.M. (2002): *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2nd edn., JohnWiley and Sons, Chichester.
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 177.
- Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. (1985): *Medicinal plants in therapy*. WHO 63:965-981
- Fellows, P.J. (2016): *Food Processing Technology*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Duxford.
- Fuentes-Alventosa, J.M., Rodríguez, G., Cermeño, P., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños J., Rodríguez-Arcos, R. (2007): Identification of flavonoid diglycosides in several genotypes of asparagus from the Huétor-Tájar population variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10028–10035
- Gelenčir, J. i Gelenčir, J. (1991) *Atlas ljekovitog bilja*. Prosvjeta, Zagreb.
- Hajtó, T., Hostanska, K., Berki, T., Pálinkás, L., Boldizsár, F., & Németh, P. (2005). Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* agglutinin-I): overview of recent results from in vitro experiments and in vivo animal models, and their possible relevance for clinical applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 59-67.

- Kunule, O.F., Egharevba, H.O., & Ahmadu, P.O. (2012): Standardization of herbal medicines – A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation* 4:101-112
- Lietava, J. (1991): Medicinal plants in Middle Paleolithic grave Shanidar IV? *Journal of Ethnopharmacology* 35:263-266
- Luczkiewicz, M., Wojciech Cisowski, P. K., Ochockaz, R., & Piotrowski, A. (2001). Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *system*, 1(5), 6.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A. (2004): Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85:231–237
- Nikolić, T. (2013) *Sistematska botanika*. Alfa, Zagreb.
- Onay-Ucar, E., Karagoz, A. & Arda, N. (2006): Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia* 77:556-560
- Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988): Phenolic compounds. U: Ough CS, Amerine MA (ur.) *Methods for analysis of musts and wines*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Phalow, M. (1989) *Velika knjiga ljekovitog bilja*. Cankarjeva založba, Zagreb.
- Pirbalouti, A.G., Mahdad, E., Craker, L. (2013): Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. *Food Chemistry* 114:2440-2449
- Potočić, Z. (1983) *Šumarska enciklopedija*. Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb.
- Radić Brkanac, S., Gerić, M., Gajski, G., Vujčić, V., Garaj-Vrhovac, V., Kremer, D., Domijan, A.M. (2015): Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 73(3):923-929
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rocha, R.P., Melo, E.C., Radünz, L.L. (2011): Influence of drying process on the quality of medicinal plants: A review. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(33):7076-7084

- Stermitz, F. R. "Plant parasites." Alkaloids. Springer, Boston, MA, 1998. 327-336.
- Strack, D. (1997): Phenolic metabolism. Plant Biochemistry. Academic Press, London.
- Sumner, J. (2000) The Natural History of Medicinal Plants. Timber Press, Portland.
- Treben, M. (2015) Zdravlje iz božje ljekarne. Mozaik knjiga, Zagreb.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology, 39(1), 44-84.
- Vicaș, S. I., Rugină D., & Socaciu, C. (2011). Comparative study about antioxidant activities of *Viscum album* from different host trees, harvested in different seasons. Journal of medicinal plants research, 5(11), 2237-2244.
- Vujčić, V., Radić Brkanac, S., Radojčić Redovniković, I., Ivanković, S., Stojković, R., Žilić, I., & Radić Stojković, M. (2017). Phytochemical and bioactive potential of in vivo and in vitro grown plants of *Centaurea ragusina* L.–Detection of DNA/RNA active compounds in plant extracts via thermal denaturation and circular dichroism. Phytochemical analysis, 28(6), 584-592.
- Willfort, R. (1989) Ljekovito bilje i njegova upotreba. Mladost, Zagreb.
- Zhishen, J., Mengchenc, T., Jianming, W. (1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry 64:555-559

Životopis

Rođen sam 1990. godine u Virovitici. Pohađao sam Osnovnu školu Josipa Kozarca u Slatini koju sam završio 2004. godine, a zatim sam upisao opću gimnaziju u Srednjoj školi Marka Marulića u Slatini. Nakon završene srednje škole upisao sam preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu koji završavam 2013. godine i upisujem studij Eksperimentalne biologije, modul botanika na istom fakultetu. U sklopu fakulteta tri puta sam sudjelovao na Noći biologije na Botaničkom zavodu.